

24. August 2001



5

Anmelderin:

Combinature Biopharm AG

Robert -Rössle-Str. 10

10

13125 Berlin

Avilamycin-Derivate

15

Die Erfindung betrifft Avilamycin-Derivate (im folgenden auch als Gavibamycine bezeichnet), gentechnologische biosynthetische Verfahren zu deren Herstellung, Arzneimittel enthaltend diese Verbindungen, sowie die Verwendung dieser Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels, bspw. gegen Infektionskrankheiten, wie auch Nukleinsäuren, Proteine und Gencluster und entsprechende Zellen, die mit der Herstellung dieser Avilamycin-Derivate verbunden sind.

25

Das Aufkommen pathogener, gegen Antibiotika multiresistenter Bakterien stellt eine wachsende Bedrohung der menschlichen Gesundheit dar und hat die Suche nach neuen Wirkstoffen verstärkt. Immer weniger neue Wirkstoffe sind in den letzten zwei Jahrzehnten bei zielspezifischen Wirkstoff-Screenings angefallen, so daß Forscher begonnen haben, neben der Suche nach neuen antibiotischen Wirkstoffen auch neue Technologien zur Herstellung neuer Verbindungen zu nutzen. Eine vielversprechende neue Technologie wird als kombinatorische

30

Biosynthese bezeichnet und benutzt biosynthetische Gene als Mittel zur Herstellung neuer Wirkstoffe.

5 Eine unter anderem in diesem Kontext interessante Verbindungsklasse sind die Orthosomycine. Sie sind eine bekannte Klasse von Antibiotika, die von verschiedenen Actinomyceten hergestellt werden. Mitglieder dieser Klasse wirken auf eine breite Palette gram-positiver pathogener Bakterien, inklusive glycopeptid-resistenter Enterococcen, methicillin-resistenter Staphylococcen und penicillin-resistenter Streptococcen.

10

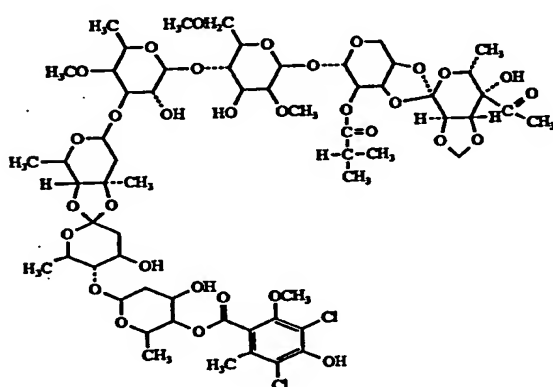
Prominente Beispiele an Orthosomycinen sind Avilamycine und Evernimycine, die von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 bzw. *Micromonospora carbonacea* hergestellt werden. Diese Antibiotika bestehen aus einer Heptasaccharid-Seitenkette und einer vom Polyketid
15 (Acetateinheiten) abgeleiteten Dichloroisoevernin-Säure als Aglykon, wobei die Zucker-Reste zum Teil über Orthoesterbindungen miteinander verknüpft sind. Diese Bindung gibt der ganzen Klasse von Orthosomycinen den Namen. Der genaue Wirkmechanismus der Orthosomycine ist unbekannt. Während für ein bestimmtes Orthosomycin
20 (Ziracin) ein Zellmembraneffekt diskutiert wurde (Walker, 1976; Langer, 1987) wird in neueren Publikationen eine Wechselwirkung mit dem ribosomalen Protein L16 angeführt (Foster und Rybak, 1999). Für ein anderes Orthosomycin, Avilamycin A, wird eine Hemmung der Proteinbiosynthese angenommen und eine Inhibition des Translations-
25 Initiationskomplexes vorgeschlagen (Wolf, 1973).

Die bekannten Avilamycine wurden 1959 aus Kulturfiltraten von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 isoliert (Buzzetti, et al., 1968; Mertz et al., 1986). Wie oben bereits angedeutet ist Avilamycin A, eine der
30 Hauptkomponenten, aus Zuckern aufgebaut. Einzelkomponenten sind D-

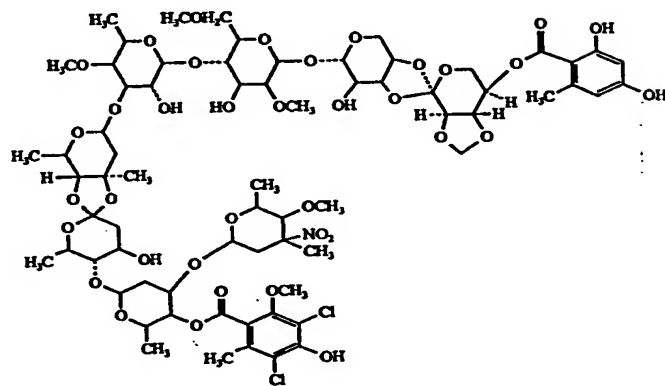
Olivose, 2-Desoxy-D-Evalose, 4-O-Methyl-D-fucose, 2,6-Di-O-Methyl-D-mannose, L-Lyxose und Methyl-Eurekanat. In Studien wies Avilamycin A ausgezeichnete Aktivität gegen multiresistente *Staphylococcus aureus* - Stämme auf (Zähner, 1999). Neben den Orthoestern soll der terminale
5 Dichloroisoeberninsäure-Rest für die Wirksamkeit essentiell sein (Wright, 1979). Die DE 1116864 beschreibt wie die US 3,131,126 die Stoffklasse der Avilamycine inclusive eines allgemeinen Hinweises auf Derivate sowie Herstellung und Wirkung von Avilamycinen.

10 Ebenfalls zur Gruppe der Orthosomycine gehört Ziracin. Ziracin (SCH27899) ist ein Evernimycin und wurde bereits klinisch getestet.

15



Avilamycin A



Ziracin

20

Sowohl beim Avilamycin A als auch beim Ziracin hat sich in der Praxis allerdings gezeigt, daß der therapeutische Einsatz durch die zu geringe Hydrophilie beschränkt zu sein scheint.

25 Gerade für die Klasse der Orthosomycine und insbesondere für die Avilamycine dürfte molekulares Klonieren und Charakterisieren der die Biosynthese von Avilamycin A bestimmenden Enzyme von großem Interesse sein, da diese Information die Richtung für die Entwicklung

neuer (antimikrobieller) Antibiotika vorgeben könnte. Die Gene sind ein interessantes System, um die Bildung und Verknüpfung ungewöhnlicher Desoxyzucker zu studieren und damit unter Umständen für eine kombinatorische Biosynthese von großem Wert.

5

Vorherige Arbeit am biosynthetischen Gencluster von Avilamycinen führte zur Entschlüsselung der Sequenz eines NDP-Glucose-Synthase-Gens (*aviD* [laufende Nr. 53 gemäß Tabelle 1]), eines NDP-Glucose-4,6-Dehydratase-Gens (*aviE1* [laufende Nr. 54 gemäß Tabelle 1]) und eines
10 Polyketid-Synthase-Gens (*aviM* [laufende Nr. 52 gemäß Tabelle 1]). Diese haben vermutlich eine Funktion als Teil einer iterativen Typ I Polyketid-Synthase zur Bildung von Orsellinsäure, einem Zwischenprodukt in der Biosynthese von Dichloroisoeberninsäure. Die Expression von *aviM* in *S. lividans* führte zur Bildung von Orsellinsäure [Gaisser, S., Trefzer, A.,
15 Stockert, S., Kirschning, A., & Bechthold, A. (1997), J Bacteriol. 179, 6271-6278].

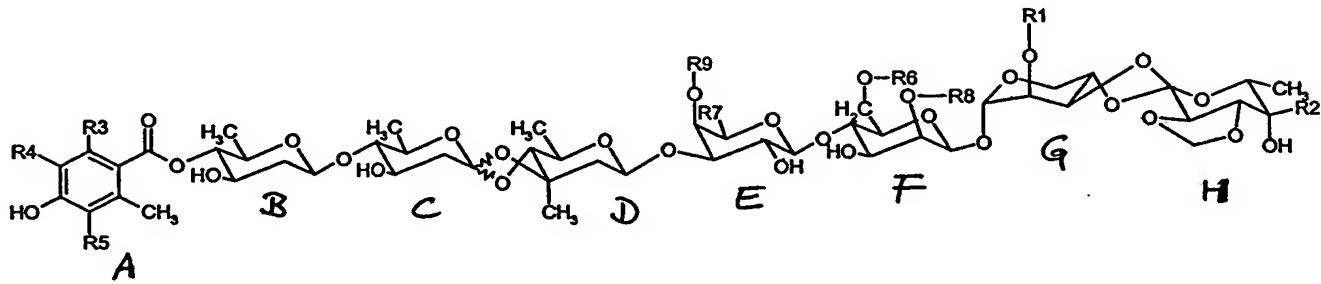
Neben dem Auffinden und Identifizieren geeigneter Enzymsysteme und Synthesewege war es daher Aufgabe der Erfindung, neue Antibiotika zur
20 Verfügung zu stellen, insbesondere auch solche, die eine verbesserte Hydrophilie aufweisen.

Überraschenderweise stellte sich heraus, daß bestimmte, im Stand der Technik nicht vorbeschriebene Avilamycin-Derivate (erfindungsgemäß
25 auch als Gavibamycine bezeichnet) - insbesondere mit einem in entscheidenden Bereichen gegenüber dem Avilamycin A veränderten Substitutionsmuster - diese Aufgabe lösen können und sowohl antibiotische Wirkung als auch verbesserte Hydrophilie zeigen. Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Avilamycin-Derivat gemäß
30 allgemeiner Formel I, auch in Form seiner Diastereomere oder

Enantiomere bzw. racemischer oder anderer Gemische oder reiner
Diastereomere und/oder Enantiomere,

5

10



15

I

20

, worin unabhängig voneinander mit unten folgender Ausnahme

R1 ausgewählt ist aus H, COCH₃, COC₄H₉, COCH(CH₃)₂ oder
COCH₂CH₃,

25

R2 ausgewählt ist aus H, CHO, COCH₃ oder CH(OH)CH₃,

R3 OCH₃ entspricht,

30

R4 Cl entspricht,

R5 Cl entspricht,

R6 CH₃ entspricht,

5 R7 H, CH₃ oder CH₂OH entspricht,

R8 CH₃ entspricht

und

10

R9 CH₃ entspricht,

worin in Bezug auf mindestens einen der Reste R3-R6, R8 oder R9 in
Formel I abweichend von der voranstehenden Definition folgendes gilt:

15

R3 ist durch OH zu ersetzen,

R4 ist durch H zu ersetzen,

20 R5 ist durch H zu ersetzen,

R6 ist durch H zu ersetzen,

R8 ist durch H zu ersetzen

25

und/oder

R9 ist durch H zu ersetzen,

mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der jeweiligen Kombination in einer der Verbindungen 1 - 4 annehmen können:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
2	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
3	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
4	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃

5

Dabei ist unter dem Ausdruck „mit unten folgender Ausnahme“ zu verstehen, daß es Ausnahmen von den diesem Ausdruck unmittelbar folgenden generellen Definitionen der Reste R1-R9 gibt, die mit der
10 Phrase „worin in Bezug auf mindestens einen der Reste R3-R6, R8 oder R9 in Formel I abweichend von der voranstehenden Definition folgendes gilt“ eingeleitet werden.

Die erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate zeichnen sich insgesamt
15 neben ihrer überraschend starken antibiotischen Aktivität insbesondere gegen *Staphylococcus aureus*, insbesondere auch durch eine gegenüber den bekannten Orthosomycinen wie Avilamycin A oder C sowie Evernimycin (=Everninomycin, =Evernimicin) deutlich verbesserten Hydrophilie aus. Gerade diese erhöhte Hydrophilie macht diese
20 Verbindungen aber zu attraktiven, insbesondere antibiotischen Wirkstoffen, da eine erhöhte Hydrophilie in bestimmten therapeutischen Anwendungen sehr erwünscht ist. Außerdem gilt für dieses wie für alle – auch folgend beschriebenen - erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate, daß es eine Struktur aufweist, die sich einer klassischen organischen
25 Synthese nur mit großer Mühe erschließt. Der hier zugrundeliegende Einsatz einer gentechnologischen Biosynthese zur Herstellung der

erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate erschließt damit veränderte, neue und bisher nicht zugängliche Wirkstoffe, insbesondere Antibiotika.

Bevorzugt ist im Rahmen dieser Erfindung ein erfindungsgemäßes Avilamycin-Derivat, in dem mindestens R3 durch OH zu ersetzen ist, mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der Kombination in der Verbindung 1 annehmen können:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

Ebenfalls bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Avilamycin-Derivat, in dem mindestens R4 und R5 in Formel I durch H zu ersetzen sind.

Ebenfalls bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Avilamycin-Derivat, in dem mindestens R6, R8 und/oder R9 durch H zu ersetzen ist/sind, mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der Kombination in der Verbindung 3 oder nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der Kombination in der Verbindung 4 annehmen können:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
3	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
4	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃

Besonders bevorzugt ist es weiter, diese Merkmale zu kombinieren, was zu einem erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivat führt, in dem zum einen mindestens R3 durch OH zu ersetzen ist und zum anderen mindestens R4 und R5 durch H zu ersetzen sind oder mindestens R6, R8 und/oder R9 durch H zu ersetzen ist/sind.

Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung, der die Aufgabe in besonders günstiger Weise löst, ist dabei ein Avilamycin-Derivat gemäß

allgemeiner Formel I, das ausgewählt ist aus Verbindungen, in denen R1-R9 jeweils die in folgender Tabelle angegebene Bedeutung haben, wie folgt kombiniert sind:

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	H	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃

COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	H	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	H	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	H	CH ₃	H

COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	H	CH ₃	H	H
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	H	CH ₃	H	H
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₂ OH	H	H
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	H	H	H
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H

, vorzugsweise

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H

5

Die Aufgabe wird auch durch Avilamycin-Derivate gelöst, die durch ein besonderes Verfahren, das gentechnologische Manipulationen und Biosynthese beinhaltet, herstellbar ist. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Avilamycin-Derivat, das dadurch erhältlich ist, daß

10 in einer kultivierbaren Zelle, die die nötigen Gene bzw. Enzyme zur Synthese eines Orthosomycin-Grundkörpers bestehend aus

- 5 (a) einem endständigen Dichloroisoeberninsäure-Rest (A in Formel I) und
(b) einem damit veresterten, über normale Esterbindung und Orthoesterbindungen verknüpften Heptasaccharid (B bis H in Formel I) aus:

- 10 (i) zwei D-Olucose-Resten (B und C)
(ii) einem 2-Desoxy-D-Evalose-Rest (D),
(iii) einem D-Fucose-Rest (E),
(iv) einem D-Mannose-Rest (F),
(v) einem L-Lyxose-Rest (G) und
(vi) einem (Methyl-)Eurekanat Rest (H)

15 aufweist, mindestens eine Nukleinsäure, deren Sequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1 bis 54 entspricht, gentechnologisch verändert, deletiert und/oder nicht exprimiert wird, die so modifizierte Zelle kultiviert wird, der
20 Kulturüberstand gewonnen und aufgearbeitet wird, das oder die Avilamycin-Derivat/e aufgereinigt und isoliert wird/werden und gegebenenfalls verschiedene Derivate getrennt werden,

25 mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der jeweiligen Kombination in einer der Verbindungen 1 - 16 annehmen können:

Nr	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
2	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
3	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
4	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃

5	COCH(CH ₃) ₂	CHO	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
6	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
7	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
8	COCH ₂ CH ₃	H	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
9	COCH ₃	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
10	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
11	H	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
12	COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
13	H	CH(OH)CH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
14	COC ₄ H ₉	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
15	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
16	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃

Dabei versteht man im Sinne der Erfindung darunter, daß „die Zelle die nötigen Gene bzw. Enzyme zur Synthese eines Orthosomycin-Grundkörpers aufweist“, daß in der Zelle die für die notwendigen Enzyme kodierenden Gene und/oder die funktionsfähigen Enzyme selbst vorhanden sind, die für die Synthese eines „Orthosomycin-Grundkörpers“ aus den üblicherweise vorhandenen Vorstufen nötig sind. Beispiele wären das erfindungsgemäße Gencluster gemäß Abb. 109 oder die „Open Reading Frames“ (ORF) bzw. Gene gemäß laufender Nummer 1-54 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1 bzw. die zugehörigen Enzyme bzw. Proteine gemäß laufender Nummer 55-108 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1.

Die Definition des „Orthosomycin-Grundkörpers“ ist bereits angegeben, wobei die Anordnung der Ortho- und der normalen Esterbindung der Formel I zu entnehmen ist. Einen solchen Grundkörper weisen unter anderem Avilamycine und Evernimycine sowie erfindungsgemäße Avilamycin-Derivate auf (s. Formel I).

Weiter versteht man im Sinne dieser Erfindung unter Gen einen Abschnitt der DNA, von dem ein einzelnes mRNA-Molekül (das dann in ein einzelnes Polypeptid oder Protein translatiert wird) oder ein funktionelles RNA-Molekül (rRNA, tRNA) transkribiert wird.

Im Sinne dieser Erfindung versteht man weiter unter „Open Reading Frame“ (ORF) einen DNA-Abschnitt, der mit einem Start-Codon beginnt, mit einem End-Codon endet und eine ununterbrochene Folge von Codons für Aminosäuren enthält. Der Begriff „Open Reading Frame“ (ORF) wird hier zur Beschreibung eines klonierten und sequenzierten DNA-Abschnitts verwendet, der einem Gen entspricht.

Unter Codon versteht man die kodierende genetische Grundeinheit. Sie besteht aus einem Triplet von drei konsekutiven Nukleotiden, die entweder für eine Aminosäure oder den Beginn oder das Ende einer Polypeptidkette kodieren.

Weiter sind im Sinne dieser Erfindung unter kultivierbaren Zellen Zellen zu verstehen, die *in-vitro* in festem oder flüssigem Medium ernährt durch eine flüssige oder verfestigte Nährlösung, dem Kulturmedium, wachsen und sich vermehren. Im engeren Sinne sind dies insbesondere Zellen von Mikroorganismen oder leicht transfizierbare Zellen, in denen entsprechende Gene zur Expression gebracht werden können. Es können dies beispielsweise grampositive und gramnegative Bakterienzellen, wie z.B. Streptomyces-Zellen (z.B. *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57), aber eben auch Systeme wie Säugetierzellen, z.B. CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary), oder immortalisierte Zelllinien, z.B. HeLa- oder HEK-Zellen, aber auch Insekten-, Fisch-, Amphibien-, Pilze- oder Hefezellen etc. sein.

Unter einer Nukleinsäure versteht man im Sinne dieser Erfindung die Grundeinheit von DNA und RNA und damit insbesondere auch die Grundeinheit eines Gens und eines ORF. Entsprechend kann eine Nukleinsäure ein Gen bzw. einen ORF umfassen und eine bestimmte Nukleinsäuresequenz (die Abfolge der Basen auf dem Phosphat-Zucker-

Rückgrat einer Nukleinsäure) entsprechend ein Gen bzw. einen ORF definieren. Unter Nukleinsäure werden auch Sequenzen verstanden, die neben den kodierenden Bereichen auch weitere Sequenzbereiche, insbesondere am 5'- oder am 3'-Ende des kodierenden Bereichs, 5 enthalten. Diese Sequenzen können funktionslos sein oder aber Promotor- oder Enhancer-Signale, bevorzugt bakterielle bzw. dem zur Expression herangezogenen Wirtszellsystem entsprechende Signale, sein. Ganz besonders bevorzugt sind neben den für die erfindungsgemäßen Proteine kodierenden Sequenzbereichen solche 10 Nukleotidsequenzen, die für sog. „Tags“ codieren (bspw. His- oder Flag-Tag), so daß die in den Wirtszellen exprimierten erfindungsgemäßen Proteine bspw. über Affinitätschromatographie ohne weiteres gereinigt werden können. An erfindungsgemäße kodierende Nukleotidsequenzen können damit beliebige Sequenzen vorzugsweise am 5' oder 3'-Ende 15 angehängt werden, die für AS-Sequenzen codieren, die einen Tag (bspw. ein Antigen) zur Bindung an einen Antikörper bspw. auf einer Säule enthalten. Mitoffenbart sind damit auch die AS-Sequenzen, die sich aus der Kombination von kodierenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit anderen Nukleotidsequenzen ergeben.

20

Unter gentechnologisch ist im Sinne der Erfindung der Einsatz verschiedener Techniken zu verstehen, mit der DNA in eine Wirtszelle eingebracht wird bzw. DNA einer Zelle spezifisch verändert wird. Darunter fällt z.B. der Einsatz von Klonierungstechniken, Vektoren, 25 Restriktionsenzymen etc..

Entsprechend heißt gentechnologisch verändert, daß ein Eingriff die Basenfolge, die Sequenz, der Nukleinsäure verändert hat, insbesondere die Basensequenz verkürzt (bis hin zur Deletion) oder Mutationen 30 eingebaut wurden, meist mit der Folge, daß die Nukleinsäure (das Gen) nicht oder nur noch verändert in eine mRNA transkribiert werden kann.

Deletiert heißt in diesem Falle, daß eine Nukleinsäure, die hier meist ein Gen oder einen ORF umfaßt, ganz oder zumindest weitgehend aus der DNA entfernt wird, so daß die Nukleinsäure (das Gen) nicht oder nur noch verändert in eine mRNA transkribiert werden kann. Nicht exprimiert

5 bedeutet entsprechend, daß die Nukleinsäure so verändert wurde, daß die Nukleinsäure (das Gen) nicht oder nur noch verändert in eine mRNA transkribiert werden kann und entsprechend nicht mehr durch Translation das Polypeptid bzw. Protein entsteht, für das die Nukleinsäure (das Gen oder der ORF) ursprünglich kodiert hat.

10

Unter mäßig stringenten Hybridisierungsbedingungen werden je nach der verwendeten Nukleinsäure-Sequenz (Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz) bzw. je nachdem, welche Nukleinsäureart (DNA oder RNA) für die Hybridisierung verwendet werden, variierende

15 Standardbedingungen verstanden. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge. Unter Standardbedingungen sind beispielsweise, je nach Nukleinsäure, Temperaturen zwischen 42 und 58

°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von: 50% Formamid, wie beispielsweise 42 °C in 5

x SSC, 50% Formamid, zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa

25 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C.

Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die

30

DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik, wie beispielsweise bei Sambrook et al. ("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln, beispielsweise abhängig von der Länge
5 der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausübel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach,
10 IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Unter Kultivierung ist im Sinne dieser Erfindung die *in-vitro* Zucht von
15 kultivierbaren Zellen zu verstehen, wodurch diese in festem oder flüssigem Medium ernährt durch eine flüssige oder verfestigte Nährlösung, dem Kulturmedium, wachsen und sich vermehren.

Dabei versteht man unter Kulturüberstand das flüssige Kulturmedium, das
20 neben den Nährstoffen für die kultivierbaren Zellen auch die von diesen nach außen ins Medium abgegebenen Metaboliten und Substanzen (z.B. Avilamycin-Derivate) enthält. Dieser Kulturüberstand kann gewonnen und aufgearbeitet werden, wobei darunter insbesondere das Absaugen des Überstandes und/oder eine Filtration zu verstehen ist, mit der die aus der
25 Kultivierung und den Zellen übriggebliebenen Feststoffe abgetrennt werden.

Der Kulturüberstand, der im Rahmen dieser Erfindung meist erfindungsgemäße Avilamycin-Derivate enthält, kann nach der
30 Aufarbeitung aufgereinigt werden, wobei darunter beispielsweise eine chromatographische Trennung und/oder Trennung über Flüssigphasen

- bzw. eine Kombination dieser Vorgehensweisen zu verstehen ist. Beispiele dafür sind eine Festphasen-Extraktion mit einem Methanol-in-Wasser-Gradienten oder eine Ethyl-Acetat-Extraktion. Dabei wird die die Avilamycin-Derivate enthaltende Fraktion möglichst weitgehend von
5 anderen, andere Bestandteile des Kulturüberstands enthaltenden Fraktionen getrennt und damit die Avilamycin-Derivate weitgehend isoliert. Als alternative Trenn- und/oder Reinigungsverfahren kommen jedoch auch die Methode des Aussalzens oder Um- oder Auskristallisierens in Betracht. Gegebenenfalls kann sich dann eine Isolierung und Trennung
10 der einzelnen Derivate anschliessen, wobei hier insbesondere Chromatographiemethoden eingesetzt werden. Ganz besonders bevorzugt sind dabei präparative HPLC-Methoden oder auch affinitätschromatographische Verfahren.
- 15 Es ist bevorzugt, wenn beim Herstellungsverfahren, über das das erfindungsgemäße Avilamycin-Derivat definiert wird, die kultivierbare Zelle ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* oder einer Zelle, die mit Ausnahme der gentechnologisch veränderten, deletierten oder nicht exprimierten Nukleinsäure/n die Nukleinsäuren
20 gemäß laufender Nr. 1-54 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1 bzw. dazu zu mindestens 95%, vorzugsweise 97 %, homologe Nukleinsäuren enthält oder aber mit einer dieser Sequenzen unter mäßig stringenten Bedingungen hybridisiert oder das Gencluster gemäß Abb. 109 enthält. Unter dem zweiten Punkt der Auswahl sind insbesondere Zellen zu
25 verstehen, in denen durch gentechnologische Methoden die für die Avilamycin-Derivat-Synthese notwendigen Enzyme exprimiert werden, wobei eine der für ein in den *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57 endogen vorkommenden Enzym-kodierenden Nukleinsäuren gentechnologisch verändert oder deletiert ist bzw. nicht exprimiert wird,
30 insbesondere die Nukleinsäure/DNA gar nicht erst gentechnologisch in die Wirtszelle eingebracht wird. Besonders bevorzugt ist es aber, wenn die

Zelle ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes*, insbesondere einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57 bzw. A 23575.

- 5 In jedem Falle ist es bevorzugt, wenn bei dem Verfahren die veränderte/n (z.B. deletierte/n bzw. nicht in die Wirtszelle eingebrachte/n) Nukleinsäure/n für eine Methyltransferase und/oder für eine Halogenase kodierte/n.
- 10 Alternativ kann die Herstellung auch außerhalb eines in-vivo-Verfahrens als in-vitro-Synthese erfolgen. Hierbei werden die für die Synthese erforderlichen Enzyme und/oder Enzymsysteme in mindestens einem Versuchsansatz vorgegeben, wobei vorzugsweise in mehreren hintereinander geschalteten Versuchsansätzen die für die Synthese
- 15 erforderlichen Reaktionsschritte katalytisch von den erforderlichen und erfindungsgemäßen Enzymen durchgeführt werden. Ggf. können zwischen die in entsprechend geeigneter Reihenfolge durchgeführten Einzelreaktionen Trenn- und/oder Reinigungsschritte zur Aufreinigung der jeweils erwünschten Zwischenprodukte eingefügt werden.
- 20 Dabei versteht man unter Methyltransferasen Enzyme, die eine Methylgruppe auf ein organisches Molekül übertragen können. Insbesondere sind dies im Sinne der Erfindung Enzyme, die entweder auf die Orsellinsäure oder auf die Zucker, vorzugsweise nach Bildung des
- 25 Heptasaccharids, eine Methylgruppe übertragen, insbesondere die ORF's aviG2, aviG3, aviG5, aviG6, aviG1, aviG4, aviRa und aviRb, insbesondere aviG4.
- Unter Halogenasen versteht man Enzyme, die enzymatisch Halogene auf organische Moleküle übertragen können. Insbesondere sind dies im Sinne
- 30 der Erfindung Enzyme, die auf die Orsellinsäure ein, vorzugsweise zwei

Cl-Reste an den Positionen R4 und/oder R5 übertragen, insbesondere der ORF aviH.

Entsprechend ist es ein besonders bevorzugter Gegenstand der
5 Erfindung, wenn in Bezug auf das oben genannte Herstellungsverfahren die Sequenz/en der veränderte/n Nukleinsäure/n vor der Veränderung zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der/den Nukleinsäuresequenz/en mindestens einer der Sequenzen gemäß
10 laufender Nr. 1 oder 2-7 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1, vorzugsweise einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1, 2, 4 oder 6 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entspricht/en, insbesondere der Sequenz mit laufender Nr. 2 oder den Sequenzen mit den laufenden Nr. 2 und Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 4 oder Nr. 2 und Nr. 6 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entspricht oder aber mit einer dieser Sequenzen unter mäßig stringenten Bedingungen hybridisiert.

15 Dabei bedeutet „vor der Veränderung“ im Sinne dieser Erfindung, daß die veränderte Nukleinsäure vor der gentechnologischen Manipulation an ihr, d.h. vor der Deletion oder der Veränderung, insbesondere Verkürzung oder Mutation in der Basensequenz, aber auch vor dem Schritt, diese
20 Nukleinsäure/DNA gar nicht erst gentechnologisch in die Wirtszelle einzubringen, die genannte Nukleinsäuresequenz aufweist.

Weiter ist es bevorzugt, wenn in dem die Avilamycin-Derivate definierenden Herstellungsverfahren die Veränderung der Nukleinsäure/n
25 dazu führt, daß das oder die durch die gentechnologisch veränderte/n Nukleinsäure/n kodierte/n Protein/e oder Polypeptid/e nach der gentechnologischen Veränderung nicht mehr synthetisiert wird/werden.

Dabei versteht man unter Polypeptid ein Peptid mit zwischen $10 \leq$ und < 100 Aminosäureresten und unter einem Protein ein Makromolekül mit
30 mehr als 100 über Peptidbindungen verknüpften Aminosäureresten. Dabei

sind die Proteine im Zusammenhang mit dieser Erfindung vorzugsweise Enzyme. Es fallen aber natürlich auch andere Proteine im Sinne dieser Erfindung unter diesen Begriff.

- 5 Die bisher beschriebenen erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate haben überwiegend bzw. alle gegenüber im Stand der Technik beschriebenen verwandten Orthosomycine, insbesondere gegenüber Avilamycin A, den Vorteil, hydrophiler zu sein, was therapeutisch erhebliche Vorteile bietet. Das gilt insbesondere für einen Vergleich mit dem Avilamycin A oder C
10 bzw. auch mit dem Evernimycin Ziracin.

Eine Aufgabe der Erfindung war es auch - neben der Bereitstellung neuer Antibiotika – die Biosynthese des Avilamycins A aufzuklären, um darauf basierend neue antimikrobielle Substanzen bzw. neue Verfahren zu deren
15 Herstellung zu entwickeln. Ein Kernpunkt war dabei die molekulare Klonierung und die Charakterisierung der an der Avilamycin-Biosynthese beteiligten Gene. Es wurde ein ca. 60 kB großes Stück um die bekannten Gene *aviD*, *aviE1* und *aviM* sequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß die beteiligten Gene in unmittelbarer Nähe voneinander in einem Cluster
20 angeordnet waren. Die Sequenz der einzelnen ORF's sowie deren Anordnung auf dem zentralen Gencluster (laufenden Nr. 1 bis 54) sind in Abb. 1 in Verbindung mit Tabelle 1, respektive Abb. 109, dargestellt. Wie bereits ausgeführt waren die Sequenz eines NDP-Glucose-Synthase-Gens (*aviD* [laufende Nr. 53 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1]), eines NDP-
25 Glucose-4,6-Dehydratase-Gens (*aviE1* [laufende Nr. 54 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1]) und eines Polyketid-Synthase-Gens (*aviM* [laufende Nr. 52 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1]) ebenso bekannt wie deren vermutliche Funktion als Teil einer iterativen Typ I Polyketid-Synthase zur Bildung von Orsellinsäure, einem Zwischenprodukt in der Biosynthese von
30 Dichloroisoeverninsäure [Gaisser, S., Trefzer, A., Stockert, S., Kirschning, A., & Bechthold, A. (1997), J Bacteriol. 179, 6271-6278].

Die durch die umfangreiche Klonierung entdeckten Sequenzen der an der Synthese der Avilamycine beteiligten übrigen ORF's sind ebenfalls der Abb. 1 zu entnehmen wie auch die relative Anordnung auf dem Gencluster der Abb. 109. Hierbei erlaubt die Angabe der laufenden Nr. aus Tabelle 1
5 die Zuordnung zur namentlichen Bezeichnung der ORFs. Unter der namentlichen Bezeichnung sind die Sequenzen Abb. 1 zu entnehmen und zwar auf die in der Beschreibung von Abb. 1 dargestellte Weise. Die genaue Klonierungsstrategie sowie weitere Einzelheiten der
10 Sequenzierung sind in den Beispielen dargestellt ebenso wie die funktionelle Analyse und Charakterisierung der gefundenen Gene (ORF's). Die Zuordnung der ORF-Kürzel zu Funktion und Sequenz (incl. abgeleiteter Proteinsequenz) kann der der Abbildungsbeschreibung folgenden Tabelle 1 entnommen werden.

15

Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung ist daher eine (oder mehrere) Nukleinsäure(n), die in ihrer Sequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Sequenzen der laufenden Nummer 1 bis 51 gemäß
20 Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1 entspricht/entsprechen oder aber mit einer dieser Sequenzen unter mäßig stringenten Bedingungen hybridisiert. Insbesondere werden auch Sequenzen mit den laufenden Nr. 48 und 49 (gemäß Tabelle 1 und Sequenzdarstellung in Abb. 1) mit Funktion als rRNA-Methyltransferasen (aviRa und aviRb) und auch die Sequenzen mit
25 den laufenden Nr. 50 und 51 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) mit Funktion als ABC-Transporter-Gene (aviABC1 und aviABC2), die Resistenzen gegen Avilamycine vermitteln, bzw. Sequenzen, die zu mindestens 95% diesen Sequenzen mit den vorgenannten laufenden Nr. entsprechen oder aber mit einer dieser Sequenzen unter mäßig stringenten Bedingungen
30 hybridisieren, in der vorliegenden Erfindung beschrieben. Im übrigen auch Mischungen von Nukleinsäuren, die beliebige Unterkombinationen der

gemäß Abb. 1 dargestellten Nukleinsäuren mit den laufenden Nr. 1 bis 51 aus Tabelle 1 darstellen, bspw. Mischungen aus zwei, drei, vier, ..., 50 Nukleinsäuren in beliebiger Kombination sind erfindungsgemäß mitoffenbart, ggf. auch als Kombination auf einem Nukleinsäurestrang
5 oder auf verschiedenen Strängen.

Dabei ist/sind insbesondere (eine) Nukleinsäure/n bevorzugt, die zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit der laufenden Nr. 1
10 bis 32 gemäß Tabelle 1 (i.V.m. Abb. 1), vorzugsweise 1 bis 7, insbesondere 1, 2, 4 oder 6, oder aber einer der Sequenzen mit der laufenden Nummer 48 bis 51 oder 43, 44 oder 46 gemäß Tabelle 1 (i.V.m. Abb. 1) entspricht/entsprechen oder die aber mit einer dieser Sequenzen unter mäßig stringenten Bedingungen hybridisiert/en.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind entsprechend auch Gencluster, die „Open reading frames“, vorzugsweise 54, enthalten, die in ihrer Nukleinsäuresequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, den Nukleinsäuresequenzen gemäß den Sequenzen
20 mit den laufenden Nummern 1 bis 54 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entsprechen oder aber mit einer dieser Sequenzen unter mäßig stringenten Bedingungen hybridisiert und die auf einem Nukleinsäurestrang oder in beliebiger Kombination auf dem einem oder dem anderen Strang angeordnet sind, vorzugsweise gemäß Abb. 109.
25 Die Gene in einem erfindungsgemäßen Gencluster können 2, drei, vier, ... , 54 erfindungsgemäße Gene, ggf. in Kombination mit den bereits bekannten genen, in beliebiger Strangverteilung und Unterkombination enthalten, insbesondere können die zwischen den ORFs liegenden Abschnitte beliebiger Nukleotidsequenz sein.

30

Damit ist insbesondere ein Gencluster gemäß Abb. 109 gemeint, aber auch Gencluster, die entsprechende Nukleinsäuren, evtl. auch in anderer Anordnung enthalten, wobei bevorzugt – aber nicht notwendig – ist, daß alle ORF's gemäß den laufenden Nummern 1-54 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) im Gencluster zu finden sind.

Unter dem Begriff Gencluster versteht man im Sinne dieser Erfindung ein Abschnitt einer DNA, auf dem sich in enger räumlicher Nachbarschaft mehrere Gene befinden. Derartige erfindungsgemäße Gencluster können in einem Vektor vorliegen, bspw. einem BAC oder YAC, einem Cosmid oder Plasmid. Vektoren, die mindestens eine erfindungsgemäße Sequenz enthalten, sind damit gleichfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Erfindungsgemäße Gene können in erfindungsgemäßen Vektoren mit weiteren Signalsequenzen oder weiteren Genen, insbesondere weiteren Antibiotika-Resistenz-Genen, kombiniert werden.

Aus den neu entdeckten Sequenzen der ORF's bzw. Gene ließen sich Protein- und Polypeptidsequenzen ableiten. Entsprechend ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung ein Protein oder Polypeptid, das in seiner Aminosäuresequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Aminosäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit den laufenden Nr. 55 – 101 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entspricht.

Dabei ist es bevorzugt, wenn das erfindungsgemäße Protein oder Polypeptid zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit den laufenden Nr. 55 bis 86 oder 97, 98 oder 100 oder 102 bis 105 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), vorzugsweise 55 bis 61, insbesondere 55, 56, 58 oder 60, entspricht.

Ein weiterer Gegenstand ist entsprechend auch ein Protein oder Polypeptid, das durch eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13 kodiert wird. Dabei versteht man unter „kodieren“ im Sinne dieser Erfindung, daß die Codons (s.o.) des entsprechenden
5 Nukleinsäureabschnitts (Gen oder ORF) für die entsprechende Aminosäuresequenz kodieren, also nach Transkription und Translation ein entsprechendes Protein oder Polypeptid mit dieser Aminosäuresequenz entsteht.

10 Insbesondere sind die erfindungsgemäßen Proteine Enzyme, bzw. Teil eines Multienzymkomplexes. Sie können aber natürlich auch andere Funktionen haben.

Da zum einen die erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate über ein
15 gentechnologisches bzw. biotechnologisches Verfahren definiert sind oder dadurch hergestellt werden, auf der anderen Seite die neu entdeckten Gene bzw. Proteine (Enzyme) in gen- bzw. biotechnologischen Verfahren zur Herstellung entsprechender Antibiotika eingesetzt werden können, haben im Rahmen dieser Erfindung nahezu zwangsläufig
20 gentechnologisch veränderte Zellen eine wichtige Funktion.

Ein weiterer Gegenstand dieser Erfindung sind daher gentechnologisch veränderte Zellen enthaltend mindestens eine nicht-endogene erfindungsgemäße Nukleinsäure, einen nicht-endogenen
25 erfindungsgemäßen Gencluster und/oder ein nicht-endogenes erfindungsgemäßes Protein oder Polypeptid.

Ebenso ist eine Zelle ein weiterer Gegenstand der Erfindung, die mindestens eine gentechnologisch veränderte Nukleinsäure, deren
30 Sequenz vor der Veränderung zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der

Sequenzen mit der laufenden Nr. 1 bis 54 (Tabelle 1 i.V.m. Abb.1) entsprach oder aber die mit einer dieser Sequenzen unter mäßig stringenten Bedingungen hybridisierte, enthält.

- 5 Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist eine Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes*, vorzugsweise vom Subtyp Tü57, bei dem mindestens eine der Nukleinsäuren mit einer Sequenz mit einer der laufenden Nr. 1-54 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) gentechnologisch verändert oder deletiert wurde. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn in
10 der entsprechenden Zelle mindestens eine der Nukleinsäuren mit einer Sequenz mit laufender Nr. 1 oder 2-7 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), vorzugsweise mit einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1, 2, 4 oder 6 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), insbesondere mit einer Sequenz mit laufender Nr. 2 oder mit Sequenzen mit den laufenden Nr. 2 und Nr. 1, Nr. 2 und Nr.
15 4 oder Nr. 2 und Nr. 6 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) gentechnologisch verändert oder deletiert wurde.

Ebenfalls besonders bevorzugt ist es, wenn die Zelle vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW4, *Streptomyces viridochromogenes*,
20 GW4-AM1, *Streptomyces viridochromogenes* GW2 oder *Streptomyces viridochromogenes* GW5 ist, wobei vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW4 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH ist, vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW4-AM1 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH,
25 R4 = H und R5 = H sind, vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW2 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH und R6 = H sind und vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW5 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH und R9 = H sind.

Gemäß obigen Ausführungen ist entsprechend ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, eines erfindungsgemäßen Genclusters, eines erfindungsgemäßen Proteins oder Polypeptids und/oder einer der erfindungsgemäßen Zellen zur Herstellung eines Avilamycin-Derivats, vorzugsweise eines erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivats.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Avilamycin-Derivate mit folgenden Schritten:

10

(1) in einer kultivierbaren Zelle, die die nötigen Gene bzw. Enzyme zur Synthese des Orthosomycin-Grundkörpers bestehend aus

15

(a) einem endständigen Dichloroisoeberninsäure-Rest (A in Formel I) und

(b) einem damit veresterten, über normale Esterbindung und Orthoesterbindungen verknüpften Heptasaccharid (B bis H in Formel I) aus:

20

- (i) zwei D-Olucose-Resten (B und C)
- (ii) einem 2-Desoxy-D-Valose-Rest (D),
- (iii) einem D-Fucose-Rest (E),
- (iv) einem D-Mannose-Rest (F),
- (v) einem L-Lyxose-Rest (G) und
- (vi) einem (Methyl-)Eurekanat Rest (H)

25

30

aufweist, wird mindestens eine Nukleinsäure, deren Sequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz mit einer der laufenden Nr. 1 bis 54 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1 entspricht oder aber eine Nukleinsäure, die mit einer dieser Sequenzen unter mäßig

stringenten Bedingungen hybridisiert, gentechnologisch verändert, deletiert oder nicht exprimiert,

- (2) die so gentechnologisch veränderte Zelle wird kultiviert,
- 5 (3) der Kulturüberstand wird gewonnen,
- (4) der Kulturüberstand wird aufgearbeitet und dabei das oder die entstandene/n Avilamycin-Derivat/e aufgereinigt und isoliert,
- (5) gegebenenfalls werden unterschiedliche Derivate getrennt.

10 Es ist bevorzugt, wenn bei diesem Verfahren die kultivierbare Zelle ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* oder einer Zelle, die mit Ausnahme der gentechnologisch veränderten, deletierten oder nicht exprimierten Nukleinsäure die Nukleinsäuren gemäß laufenden Nr. 1-54 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1 bzw. dazu zu
15 mindestens 95%, vorzugsweise 97 %, homologe Nukleinsäuren oder aber mit diesen Sequenzen hybridisierende Sequenzen enthält oder den erfindungsgemäßen Gencluster enthält. Letzteres wird in der Fachliteratur als heterologe Expression bezeichnet. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn die Zelle ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces*
20 *viridochromogenes*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces albus* oder *Streptomyces fradiae*, insbesondere einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57 oder A 23575.

Auch eine alternative Verfahrensführung kommt erfindungsgemäß in
25 Betracht. Hierbei wird nach Durchführung der Verfahrensschritte (1) und (2) jedoch das Avilamycin-Derivat nicht aus dem Kulturüberstand gewonnen, sondern dieses akkumuliert sich vielmehr in den Wirtszellen. Gemäß dem alternativen Verfahren werden daher in Verfahrensschritt (3) die Wirtszellen geerntet, nachfolgend aufgeschlossen und die Avilamycin-
30 Derivate von den übrigen Zellbestandteilen getrennt und schließlich

aufgereinigt. Zur Trennung und Aufreinigung können die vorgenannten und alle dem Fachmann geläufigen Verfahren zum Einsatz kommen.

Weiter bevorzugt ist es, wenn bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die
5 veränderte/n Nukleinsäure/n für eine Methyltransferase und/oder für eine
Halogenase kodiert/en. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn die
Sequenz/en der veränderte/n Nukleinsäure/n vor der Veränderung zu
mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der/den
Nukleinsäuresequenz/en mindestens einer der Sequenzen mit den
10 laufenden Nr. 1 oder 2-7 gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1, vorzugsweise
einer Sequenzen mit den laufender Nr. 1, 2, 4 oder 6 (Tabelle 1 i.V.m.
Abb. 1), entspricht/en, insbesondere der Sequenz mit laufender Nr. 2 oder
den Sequenzen mit den laufenden Nr. 2 und Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 4 oder
Nr. 2 und Nr. 6 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1).

15

Weiter bevorzugt ist es, wenn bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die
Veränderung der Nukleinsäure/n, insbesondere von erfindungsgemäßen
Methyltransferasen und/oder Halogenasen, dazu führt, daß das oder die
durch die gentechnologisch veränderte/n Nukleinsäure/n kodierte/n
20 Protein/e oder Polypeptid/e nach der gentechnologischen Veränderung
nicht mehr synthetisiert wird/werden.

Die erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate sind prinzipiell toxikologisch
unbedenklich, so daß sie sich als pharmazeutischer Wirkstoff in
25 Arzneimitteln eignen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher
Arzneimittel enthaltend mindestens ein erfindungsgemäßes Avilamycin-
Derivat, vorzugsweise mindestens zwei, insbesondere auch Mischungen
von einem oder mehreren Avilamycin-Derivaten mit mindestens einem
weiteren Antibiotikum aus dem Stand der Technik, bspw. Vancomycin,
30 Penicillin, Streptomycin, Neomycin, Kanamycin, Sisomycin, Amikacin
und/oder Tobramycin, sowie gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder

Hilfsstoffe. Auch andere bakteriostatische oder bakterizide Substanzen können mit erfindungsgemäßen Substanzen kombiniert werden, bspw. Cephalosporine, Chloramphenicol, Ethambutol, Cephalosporine, Isonicotinamide, Tetracycline, Sulfonamide, Oxalactame (bspw. Flomoxef, 5 Clavulansäure) und/oder Nitrofurane.

Darunter versteht man insbesondere auch Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, Farbstoffe und/oder Bindemittel. Die Arzneimittel können als flüssige Arzneiformen in Form von 10 Injektionslösungen, Tropfen oder Säften, als halbfeste Arzneiformen in Form von Granulaten, Tabletten, Pellets, Patches, Kapseln, Pflaster oder Aerosolen verabreicht werden. Die Auswahl der Hilfsstoffe etc. sowie die einzusetzenden Mengen derselben hängen davon ab, ob das Arzneimittel oral, peroral, parenteral, intravenös, intraperitoneal, intradermal, 15 intramuskulär, intranasal, buccal, rektal oder örtlich, zum Beispiel auf die Haut, die Schleimhäute oder in die Augen, appliziert werden soll. Für die orale Applikation eignen sich Zubereitungen in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Granulaten, Tropfen, Säften und Sirupen, für die parenterale, topische und inhalative Applikation Lösungen, Suspensionen, 20 leicht rekonstituierbare Trockenzubereitungen sowie Sprays.

Oral oder perkutan anwendbare Zubereitungsformen können die erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate verzögert freisetzen und so einen gleichmäßigeren Plasmaspiegel erreichen. Prinzipiell können den 25 erfindungsgemäßen Arzneimitteln andere dem Fachmann bekannte weitere Wirkstoffe zugesetzt werden.

Die an den Patienten zu verabreichende Wirkstoffmenge variiert in Abhängigkeit vom Gewicht des Patienten, von der Applikationsart, der

Indikation und dem Schweregrad der Erkrankung. Üblicherweise werden 0,005 bis 1000 mg/kg, bevorzugt 0,05 bis 5 mg/kg wenigstens eines erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivats appliziert.

- 5 Da für die erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate eine antibiotische Wirkung nachgewiesen ist, eignen sie sich natürlich prinzipiell zur Behandlung von Erkrankungen, insbesondere zur Behandlung von Infektionskrankheiten, bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung derartiger Erkrankungen. Ein weiterer Gegenstand der
- 10 Erfindung ist entsprechend die Verwendung eines erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivats zur Herstellung eines Arzneimittels mit antibiotischer Wirkung zur Behandlung von bspw. Infektionskrankheiten. Unter Infektionserkrankungen werden Erkrankungen verstanden, denen eine Infektion mit einem viralen, einem bakteriellen oder einem
- 15 protozoologischen Erreger zugrundeliegt. Damit sind die vorliegenden erfindungsgemäßen Antibiotika auch zur Behandlung von Mykosen, insbesondere kutanen und subkutanen Mykosen, geeignet.

- Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate jedoch zur
- 20 Bekämpfung bakterieller Infektionen eingesetzt. Insbesondere sind Infektionen mit den folgenden Erregern zu nennen: Leprabakterien, Mykobakterien, Neisserien, Tuberkulosebakterien, Aktinomyceten, Corynebakterien, Listerien, Clostridien, Bazillen, Enterokokken, Streptokokken, Staphylokokken, insbesondere auch zur Behandlung von
- 25 Infektionen mit *Staphylococcus aureus* Stämmen, Rickettsien, Chlamydien, Mykoplasmen, Borrelien, Spirochäten, Brucellen, Bortedellen, Pseudomonaden, Helicobacter, Hämophilus, Vibrionen, Shigellen, Yersinia, Salmonellen und weitere unter die Familie der Enterobacteriaceae fallende Vertreter. Entsprechend werden die
- 30 erfindungsgemäßen Substanzen zur Behandlung aller klinischen Krankheitsbilder, die durch bspw. die vorgenannten Bakterienstämme

verursacht werden, verwendet. Beispielhaft seien die folgenden Krankheitsbilder genannt: Tuberkulose; Pneumonien; Typhus; Paratyphus; Lues; Gastritis; Gastroenteritis; Ruhr; Pest; Enteritis; extraintestinale Infekte, Peritonitis und Appendizitis mit *E. coli* sowie intestinale Infekte mit
5 EHEC, EPEC, ETEC oder EIEC; Cholera, Legionärskrankheit, Keuchhusten, Brucellosen, Lyme-Borreliose, Leptospirose, Fleckfieber, Trachom, Gonorrhoeen, Meningitis, Septikämie, Lepra etc.

Ein weiterer Gegenstand des Verfahrens ist auch die Behandlung eines
10 Menschen oder Tieres, der oder das diese Behandlung benötigt, mit einem erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivat, vorzugsweise bei Infektionskrankheiten, insbesondere unter Beteiligung von *Staphylococcus aureus*.

15 Im folgenden Abschnitt wird die Erfindung weiter durch Beispiele erläutert, ohne sie darauf zu beschränken.

Beispiele und Abbildungen:

20

Abbildungen:

Abbildung 1 zeigt die Sequenz des gesamten Genclusters mit seinen 54 Nukleinsäuresequenzen der ORF's aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57. In Abbildung 1 sind die Kurzbezeichnungen der entsprechenden
25 Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei diese Kurzbezeichnungen (ohne das Präfix „Avi“) jeweils an den Zeilen eingefügt sind, die die Startcodons der 54 Sequenzen aufweisen. Die AS, die durch das jeweilige Startcodon codiert wird, ist eingekreist. Der an diesen Stellen jeweils eingezeichnete Pfeil gibt die Leserichtung (rückwärts oder vorwärts) der Gene mit dem
30 Startcodon als Ausgangspunkt wieder.

Abb. 1 enthält die Nukleotidsequenzen der beiden komplementären DNA-Stränge ebenso wie die (tw. fiktiven) AS-Sequenzen für beide Stränge in allen drei Leserastern, insgesamt also 2 Nukleotidsequenzen und die sich
5 hieraus potentiell ergebenden 6 Proteinsequenzen (Ein-Buchstaben-Code). Die drei Proteinsequenzen des oberen Nukleotidstrangs sind oberhalb der dazugehörigen Nukleotidsequenz, die drei Proteinsequenzen des unteren komplementären Nukleotidsequenz unterhalb des dazugehörigen unteren Nukleotidstrangs eingezeichnet. Die 54 namentlich
10 in Abb. 1 eingezeichneten Proteinsequenzen im Gencluster ergeben sich aus Abb. 1 dadurch, daß eine eingekreiste AS als Ausgangspunkt gewählt wird und dann in diesem Leseraster, d.h. in der entsprechenden Zeile (bspw. 2. Zeile unterhalb der unteren Nukleotidsequenz), die AS-Sequenz in der durch die Pfeile angegebenen Richtung, also im folgenden
15 entweder vorwärts oder rückwärts, abgelesen wird. Die Sequenz endet mit dem Stop-Codon im entsprechenden Leseraster, wobei Stop-Codons durch ein „Stern“-Symbol in der entsprechenden Zeile markiert sind.

Die zur AS eines ORFs gehörige Nukleotidsequenz ergibt sich durch das
20 entsprechende oberhalb oder unterhalb (für den oberen Strang) befindliche Triplet. Die Ein-Buchstaben-Bezeichnung der Aminosäure ist dabei jeweils so angeordnet, daß sie oberhalb oder unterhalb des mittleren Nukleotids des für diese AS kodierenden Codons liegt.

25 In der nachfolgenden Tabelle sind die namentlichen Bezeichnungen der 54 kodierenden Bereichen im Gencluster jeweils laufenden Nummern zugeordnet, wobei die laufenden Nummern 1 bis 54 die Nukleotidsequenzen angeben und die laufenden Nummern 55 bis 108 den jeweils dazu gehörigen AS-Sequenzen entsprechen, und zwar codiert die
30 Nukleotidsequenz mit der laufenden Nummer 1 für die AS mit der

laufenden Nummer 55, die Nukleotidsequenz mit der laufenden Nummer 2 für die AS mit der laufenden Nummer 56 etc..

5 Abbildung 109 zeigt die relative Anordnung der gefundenen ORF's auf dem Gencluster.

Abbildung 110 zeigt einen Southern-Blot mit der Mutante S. *viridochromogenes* GW4.

10 Abbildung 111 zeigt das Massenspektrum der Produkte von Mutante S. *viridochromogenes* GW4

Abbildung 112 zeigt das Massenspektrum der hydrolysierten Produkte von Mutante S. *viridochromogenes* GW4.

15

Die Zuordnung der ORF-Kürzel zu ihrer Funktion und Sequenz (incl. abgeleiteter Proteinsequenz) kann der folgenden Tabelle 1 entnommen werden.

20

Tabell 1:

G n (ORF)/ Protein bzw. Polypeptid	Funktion	Laufende Nr.: Gen (ORF) / Protein bzw. Polypeptid in Abb. 1
AviX1	Regulation	8/62
AviX2		33/87
AviX3		34/88
AviX4		35/89
AviX5		36/90
AviRb	Resistenz/ Methylierung der rRNA	48/102
AviX6		37/91
AviX7		38/92
AviX8		39/93
AviRa	Resistenz/Methylierung der rRNA	49/103
AviQ1	Zucker-Biosynthese	9/63
AviGT2	Biosynthese der Heptasaccharid-Kette	10/64
AviX9		40/94
AviC1	Regulation	11/65
AviC2	Regulation	12/66
AviX10		41/95
AviX11		42/96
AviG1	Zucker-Biosynthese (2-Desoxy-D-Evalose)/ Modifikation (Methylierung)	3/57
AviJ	Antibiotika Transport	13/67
AviN	Biosynthese der Orsellinsäure	14/68
AviM	Biosynthese der Orsellinsäure	52/106
AviD	Zucker-Biosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy- D-Evalose)	53/107
AviE1	Zucker-Biosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy- D-Evalose)	54/108
AviQ2	Zucker-Biosynthese	15/69
AviG5	Modifikation (Methylierung)	6/60
AviO1	Modifikation	43/97
AviGT1	Biosynthese der Heptasaccharid-Kette	16/70
AviE2	Zucker-Biosynthese	17/71
AviG2	Modifikation (Methylierung)	4/58
AviZ1	Zucker-Biosynthese	18/72
AviG6	Modifikation (Methylierung)	7/61
AviO3	Modifikation	44/98
AviG3	Modifikation (Methylierung)	5/59
AviX12		45/99
AviABC1	Antibiotika Transport	50/104
AviABC2	Antibiotika Transport	51/105

AviB1	Modifikation	19/73
AviB2	Modifikation	20/74
AviGT3	Biosynthese der Heptasaccharid-Kette	21/75
AviGT4	Biosynthese der Heptasaccharid-Kette	22/76
AviO2	Modifikation	46/100
AviP1	Zucker-Biosynthese (L-Lyxose)	23/77
AviQ3	Zucker-Biosynthese	24/78
AviH	Modifikation (Halogenierung)	1/55
AviX13		47/101
AviG4	Modifikation (Methylierung)	2/56
AviE3	Zucker-Biosynthese (4-O-methyl-L-fucose)	25/79
AviS	Zucker-Biosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-Evalose)	26/80
AviT	Zucker-Biosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-Evalose)	27/81
AviZ3	Zucker-Biosynthese (D-Olivose, 2-Desoxy-D-Evalose)	28/82
AviZ2	Zucker-Biosynthese	29/83
AviX14	Regulation	30/84
AviX15	Regulation	31/85
AviX16	Regulation	32/86

Beispiele

5 Beispiel 1

Allgemeine Methoden und Materialien:

a)

Bakterienstämme, Plasmide und Kulturbedingungen.

10

Streptomyces viridochromogenes Tü57 wurde mit 1 % Malzextrakt, 0.4 % Hefeextrakt, 0.4 % Glucose und 1 mM CaCl₂, bei einem pH von 7.2 (HA medium) bei 37°C kultiviert. Zur Herstellung von Avilamycin A wurden *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 und alle Mutanten in NL19+-
 15 Medium, das 2% D-Mannitol, 2% Sojamehl und 20 mM L-Valin enthielt und auf pH 7.5 eingestellt war, kultiviert. Für die DNA-Manipulation wurde

Escherichia coli XL-1 Blue MRF' (Stratagene) als Wirtszelle benutzt. Vor der Transformation von *S. viridochromogenes* Tü57 wurden die Plasmide in *E. coli* ET 12567 (*dam*⁻, *dcm*⁻, *hsdS*, Cm^R) angezogen, um unmethylierte DNA zu erhalten. *E. coli* Stämme wurden auf Luria-Bertani (LB) Agar oder flüssigem Medium, das das geeignete Antibiotikum enthielt, kultiviert.

b)

10 Allgemeine gentechnologische Manipulationen, PCR und DNA Sequenzierung / Sequenz-Analyse

Es wurden Standard-Methoden der Molekularbiologie - wie dem Fachmann bekannt - durchgeführt. Die Isolierung von *E.coli* Plasmid DNA, DNA Restriktion, DNA Modifizierung wie das „filling-in sticky ends“ und die „Southern“-Hybridisierung wurden gemäß den Protokollen der Hersteller der Kits, Enzyme und Reagentien durchgeführt (Amersham-Pharmacia, Boehringer Mannheim, Promega, Stratagene). *Streptomyces* Protoplastenbildung, -transformation, und -regenerierung wurden wie üblich durchgeführt. Die PCR wurde mit einem Perkin Elmer GeneAmp 2400 thermal cycler durchgeführt, wobei die Bedingungen so wie beschrieben und üblich waren. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer waren:

25 AviG4F (5'-GGACGCCTATCTGTGCCACCCCTTCCTGGT-3'),
AviG4R (5'-TGAGCGCTCGCCTAGACAGAATCATCTCCC3'),
S2A (5'-GCGTCCATCTTGCCGGGA-3') und
S2B (5'-CGTGGATCCCGCCGGCCC-3').

30 Die Nukleotidsequenzierung wurde mit der Dideoxy-

Kettenabbruchsmethode unter Verwendung eines automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequencers (Perkin Elmer ABI) durchgeführt. Die Sequenzierungs-Reaktionen wurden mit einem Thermosequenase-Cycle-Sequencing Kit mit 7-deaza-dGTP (Amersham) und Standard-Primern (M
5 13 universal and reverse, T3, T7) durchgeführt. Mit dem DNASIS-Software-Paket (version 2.1, 1995; Hitachi Software Engineering) wurde eine computerunterstützte Sequenz-Analyse und die Datenbank-Recherche mit dem BLAST 2.0 program auf dem Server des National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA, durchgeführt.
10 Die vorgelegten Sequenzen sind in der „GenBank“-Datenbank unter der Zugangsnummer („Accession Number“) AF333038 abgelegt.

c)

Konstruktion eines Gen-inaktivierenden Plasmids

15

aviG4: Eine einmal vorkommende *NcoI*-Restriktionsschnittstelle im Gen *aviG4* (laufende Nr. 2, Abb. 1), die auf dem 1.9 Fragment liegt, das in die *SacI* und *EcoRI* Schnittstellen von pBSK- ligiert ist, wurde für die gezielte Inaktivierung durch ein Verschieben des Leserahmens ausgewählt. Das
20 1.9 kb Fragment wurde mit *SacI* und *KpnI* verdaut und wurde in das Gen-Inaktivierungsplasmid pSP 1 hineinligiert. Nach dem Restriktionsverdau mit *NcoI*, Behandlung mit dem Klenow -Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I und erneuter Ligation wurde die beabsichtigte Veränderung durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Das gebildete Plasmid wurde als
25 pMIKG4E3 bezeichnet.

aviH: Die einmal vorkommende *NarI* Schnittstelle im *aviH*-Gen, das auf dem 3.7 kb *SacI*-Fragment ligiert in pBSK- vorliegt, wurde durch *NarI*-Restriktionsverdau und anschließender Behandlung wie für *aviG4*
30 beschrieben, verändert. Die Sequenzierung verschiedener Plasmide

zeigte die korrekte Veränderung. Das 3.7 kb-Fragment wurde in pSP1 kloniert, um das Gen-Inaktivierungs-Plasmid pSP 1S2Nar zu bilden.

d)

5 Analyse neuer Avilamycin-Derivate

DC- Analyse

Streptomyces viridochromogenes Tü57 und die Mutanten GW-4 und GW4-AM1 wurden drei Tage lang inkubiert. Die Kulturen wurden abfiltriert und das Filtrat auf eine Festphasen Extraktions-Patrone aufgetragen (SepPakC₁₈, Waters). Die Patrone wurde mit einem Gradienten zwischen 10 % und 100% Methanol in Wasser eluiert. Avilamycin-Derivate eluieren mit der Fraktion, die 60-70 % Methanol enthält. Nach einer Extraktion mit Ethyl-Acetat und Abziehen des Lösungsmittels wurden die Avilamycin-Derivate wieder in Methanol gelöst und mittels DC auf Silicagel-Platten (silica gel 60 F254, Merck) mit Methylenchlorid/Methanol (9:1, v/v) als Lösungsmittel gemessen. Avilamycin-Derivate waren nach Behandlung mit Anisaldehyd/H₂SO₄ detektiert worden.

20 e)

HPLC-UV-Analyse

Eine analytische HPLC-UV wurde auf einem Hewlett Packard 1090 Liquid Chromatograph mit einem Photodioden-Array-Detektor und einer HP-ODS-Hypersil 5Mm, 200 x 2 mm Säule durchgeführt. Die Abfolge der Lösungen war wie folgt: Lösung A, 0.04M (NH₄)₂HPO₄ pH 7.0 Puffer; Lösung B, 100% Methanol; ein nichtlinearer Gradient, mit 30-62% der Lösung B über 25min bei einer Flußrate von 0.2ml/min verteilt.

f)

HPLC-MS-Analyse

Für die HPLC-MS-Analyse wurden die Avilamycin-Derivate auf einer
5 HPLC-Anlage (HP 1110, Hewlett-Packard, Waldbronn) mit einer HP ODS
Hypersil C₁₈ Säule (2.1 by 100 mm; 5 µm) bei einer Flußrate von 0.1
ml/min, Detektion bei 220 nm und dem folgenden Gradienten laufen
gelassen: 0-5 min von 0 % bis 20 % B, 5.1-120 min bis 90 % B (Lösung A,
H₂O : MeOH 3:2; Lösung B, MeOH). Massenspektren wurden auf einem
10 Bruker Esquire-LC 1.6n Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen)
mit einer Elektrospray (ES) Ionenquelle (positive ion mode) aufgezeichnet.
Die Meßbreite betrug zwischen 200 - 1800 m/z.

g)

15 GC-MS-Analyse

Eine Analyse der neuen Gavibamycin-Derivate (erfindungsgemäßen
Avilamycin-Derivate), die durch die mutierte Zelle *Streptomyces*
viridochromogenes GW4 synthetisiert worden waren, wurde nach
20 Etylierung mit GC-MS-Analyse durchgeführt. Die Derivate wurden in einer
Mischung aus DMSO und Acetonitril (3:40) gelöst. Nach Zugabe von
Ethyljodid und K₂CO₃ lief die Reaktion über Nacht ab. Nach Abziehen des
Lösungsmittels wurden die Derivate mit HCl/Methanol bei 115⁰C für 15
min hydrolysiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurden die Derivate
25 mit Diethylether extrahiert und mit GC-MS analysiert. Ein Hewlett Packard
5973 MSD System wurde verwendet, um EI (electron impact) Spektren
(Säule: SE54, 12m x 0.25mm; d_i= 0.125µ). Die Säulentemperatur wurde
wie folgt programmiert: 50⁰C für 2 min; 25⁰C/min bis 100⁰C; 5⁰C/min bis
250⁰C.

Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung des Avilamycin Clusters

5 Ein 60kb Abschnitt des Chromosoms des *S. viridochromogenes* Tü57, das Gene enthält, die an der Biosynthese von Avilamycinen beteiligt sind, wurde kloniert und sequenziert. Eine Analyse der DNA-Sequenz ergab 54 „open reading frames“. Es war bereits bekannt, daß das NDP-Glucose 4,6-Dehydratase Gen *aviE* und das Orsellinsäure Synthase-Gen *aviM*
10 essentiell für die Biosynthese von Avilamycin A sind. Es wurde die DNA, die die *aviE* und *aviM*-Gene flankiert, isoliert und sequenziert, um den biosynthetischen Avilamycin-Gencluster zu identifizieren. Ein 17.6 kb Stück upstream von *aviM* und ein 35.9 kb Stück downstream von *aviE* wurden sequenziert. Die sequenzierten Gene und ihre Funktion sind
15 Tabelle 1 zu entnehmen. Abb. 109 zeigt die genetische Anordnung des biosynthetischen Avilamycin-Genclusters. Der Cluster wird durch ein Avilamycin-Resistenz-Gen (*aviRb*) und einem Desoxyzucker-Synthese-Gen (*aviZ2*) flankiert. Im Zentrum des sequenzierten Abschnitts sind 25 Gene (*aviX10- aviGT4*), die alle in gleicher Richtung transkribiert werden.

20

Beispiel 3

Analyse der ORF's

a) Allgemein

25 Es wurde eine Computeranalyse der gefundenen Sequenzen der ORF's durchgeführt. Überwiegend wurden die Ergebnisse eines Sequenzvergleichs mit den Kenntnissen über die Biosynthese des Avilamycins A in Verbindung gesetzt. Die Ergebnisse dieser auf die vorliegenden Experimente gestützten Überlegungen sind in Tabelle 1

abzulesen.

Im folgenden werden die funktionellen Überlegungen an ausgewählten Beispielen, insbesondere den Methyltransferasen und Halogenasen
5 vorgestellt.

b)

**Gene mit einer Funktion in der Biosynthese von
Dichloroisoeberninsäure**

10

AviM ist für die Bildung von Orsellinsäure während der Avilamycin-Biosynthese verantwortlich. *AviN*, das upstream von *aviM* liegt, dürfte für ein Enzym, das das Startsignal für die Orsellinsäure-Synthese kontrolliert, kodieren. Die Biosynthese von Dichloroisoeberninsäure (A in Formel I)
15 ausgehend von Orsellinsäure setzt Methylierung und Di-Halogenierung voraus. Überraschend wurde festgestellt, daß AviG4, das DmpM, einer O-Demethylpuromycin-O-Methyltransferase aus *S. alboniger* (44% identische AS) ähnelt, und AviH, die PltA, einer Halogenase aus *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, die an der Pyoluteorinbiosynthese (39%
20 identische AS) beteiligt ist, ähnelt, für die Modifizierung der Orsellinsäure verantwortlich sind.

c)

Gene mit einer Funktion in der Biosynthese von Desoxy-Zuckern.

25

2-Desoxy-D-Evalose unterscheidet sich von D-Olucose in einer Methylgruppe an C3-Position. Es ist anzunehmen, daß dNDP-4-keto-2,6-Dideoxy-D-Glucose ein wichtiges Zwischenprodukt in der Biosynthese dieses methylierten Desoxyzuckers ist. Methylierung durch AviG1, das
30 TylCIII ähnelt, einer 3C-Methyltransferase aus *S. fradiae* (54% identische

AS), und Ketoreduktion durch entweder AviZ1 oder AviZ2, die beide Ketoreduktasen und Oxidoreduktasen ähneln, komplettieren die Biosynthese.

5 d)

Gene mit einer Funktion in der Modifikation der Heptasaccharid-Kette

Neben *aviG1*, *aviG4*, *aviRa* und *aviRb* wurden vier weitere Methyltransferase-Gene im Cluster gefunden (*aviG2*, *aviG3*, *aviG5* und
10 *aviG6*). Sie wurden dadurch als potentielle Methyltransferase-Gene identifiziert, daß entweder ihr Produkt Methyltransferasen aus anderen Organismen ähnelt, oder daß sie Motive enthalten, die typischerweise in verschiedenen methylierenden Proteinen gefunden werden. Es wurden
15 von einer erfindungsgemäßen Zelllinie verschiedene Avilamycin-Derivate, die keine Methylgruppe an verschiedenen Positionen im Molekül enthielten, produziert. Das weist darauf hin, daß die Methylierung zu einem sehr späten Zeitpunkt der Biosynthese erfolgt. *aviG2*, *aviG3*, *aviG5* und *aviG6* dürften am D-Fucose-Rest (E), D-Mannose-Rest (F) und am Methyl-Eurekanat-Rest (H) von Avilamycin A methylieren.

20

Beispiel 4

Herstellung einer *aviG4*-Gen Substitutionsmutante

Zur Inaktivierung von *aviG4* wurde das Plasmid pMIKG4E3 konstruiert (s.
25 Beispiel 1), um den Ersatz des Wildtyp-Gens durch ein mutiertes Allel zu erlauben. Nach Bildung von Protoplasten und Transformation von *S. viridochromogenes* mit dem Plasmid pMIKG4E3, wurden Erythromycin resistente Kolonien erhalten. Die Transformationseffektivität war ungefähr 10 Kolonien pro µg Plasmid-DNA. Mehrere Kolonien wurden ohne

Erythromycin auf Platten kultiviert, um nach dem Verlust der Resistenz zu selektieren. Verschiedene sensitive Kolonien wurden erhalten, was darauf hindeutet, daß es sich um die Folge eines „double cross-over“ handelt. Zwei Mutanten, G4/24/20 und G4/24/30, wurden weiter untersucht. PCR-Fragmente, die unter Benutzung der Primer aviG4F- und aviG4R-DNA von G4/24/20 und G4/24/30 amplifiziert wurden, konnten nicht von *NcoI* geschnitten werden, während PCR-Fragmente aus Wildtyp-DNA von diesem Enzym geschnitten werden konnten. Um die Deletion in *aviG4* nachzuweisen wurden wie folgt Southern-Blot-Analysen durchgeführt. *NcoI*-geschnittene, chromosomale DNA wurde aus G4/24/20 und G4/24/30 gewonnen. Als diese DNA mit einem 1.9 kb-Fragment, das das ganze *aviG4*-Gen enthielt, hybridisiert wurde, wurde ein 11 kb-Fragment detektiert, während die zu erwartenden 5 kb- und 6 kb-Fragmente in der *S. viridochromogenes* Tü57 Linie gefunden wurden (Abb. 110). Die Mutante G4/24/30 wurde unter dem neuen Namen *S. viridochromogenes* GW4 für weitere Experimente genutzt.

Beispiel 5

Herstellung einer *aviG4*-- *aviH* Doppelgen-Ersatz-Mutante

Das Plasmid pSP 1 S2Nar wurde entwickelt, um das *aviH*-Gen auszuschalten (s. Beispiel 1). *S. viridochromogenes* GW4 Protoplasten wurden mit diesem Plasmid transformiert. Es traten ca. 20 erythromycin-resistente Kolonien pro µg DNA auf. Einige davon wurden zum Screening, ob die Erythromycin-Resistenz verloren geht (was ein „double-cross-over“ anzeigt), kultiviert. Die Mutante GW4-AM1 wurde für weitere Experimente ausgewählt. Ein 1.34 kb PCR-Fragment, das unter Verwendung der Primer S2A und S2B aus H/3/16 gewonnen wurde, konnte von *NarI* nicht geschnitten werden, während das PCR-Fragment aus GW4 vom Enzym verdaut wurde. Um die Deletion in *aviH* nachzuweisen wurde eine

Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Chromosomale DNA aus H/3/16 wurde mit *NarI* geschnitten und mit einer 3,7 kb Sonde, die das *aviH*-Gen enthielt, hybridisiert. Es wurde ein 5.7 kb-Fragment detektiert, während bei chromosomaler DNA aus GW4 die Fragment erwartungsgemäß bei
5 4.3 kb und 1.4 kb lagen (nicht gezeigt).

Beispiel 6

Vervollständigung von *S. viridochromogenes* GW4 und *S. viridochromogenes* GW4-AM1

10

Um klar zu überprüfen, ob die Mutation nur die gewünschten und keine anderen Gene betrifft, wurden *aviG4* und *aviH* hinter dem *ermE*-up Promoter ligiert, in das Integrationsplasmid pSET152 einkloniert und durch Protoplasten-Transformation in die entsprechenden Mutanten eingeführt.
15 Die Produktion von Avilamycinen bzw. Gavibamycinen wurde wieder hergestellt. Damit ist jede Art von „upstream“- oder „downstream“-Effekt auszuschließen.

Beispiel 7

20 Analyse der neugebildeten Avilamycin-Derivate durch *S. viridochromogenes* GW4 und *S. viridochromogenes* GW4-AM1

Avilamycin A (M+Na: 1425) und Avilamycin C (M+Na: 1427) wurden in Extrakten von *S. viridochromogenes* Tü57 durch Flüssigchromatographie
25 (LC)-Massenspektrometrie-Analyse nachgewiesen. Avilamycin C war die Hauptkomponente. Messung bei hoher Auflösung zeigte, daß beide Verbindungen 2 Chloratome enthalten, die an ihrem typischen Isotopenmuster erkannt werden können. Die Masse der zwei durch *S. viridochromogenes* GW4 gebildeten Hauptverbindungen war 1411 (M+Na)

und 1413 (M+Na) (Abb. 111) was zeigt, daß *aviG4* wirklich für eine Methyltransferase kodiert. Die Hauptprodukte der Mutante GW4 wurden isoliert, durch Behandlung mit Ethyliodid ethyliert und unter Verwendung von Methanol und Salzsäure hydrolysiert. Die Reaktionsprodukte wurden
5 durch GC-MS analysiert. Das Massenspektrum dieser Probe zeigte mehrere Peaks (Abb. 112). Der Peak bei m/z 436 entspricht dem D-Olivosylester der Dichloro-di-O-ethyl-orsellinsäure und die meisten weiteren Peaks (m/z 405, m/z 275, m/z 247) entsprachen Fragmenten, die vom Orsellinsäure-Rest ausgehen (Abb. 112). Das legt den Schluß nahe,
10 daß die Differenz zwischen Avilamycin A (C) und dem neuen Derivat, Gavibamycin A1 (A3), aus einer Veränderung der Struktur des Orsellinsäure-Rests resultiert.

Gavibamycin A1 und A3 entsprechen der allgemeinen Formel I mit der
15 folgenden Bedeutung für die Reste R1-R9:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
A1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
A3	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

S. viridochromogenes GW4-AM1 wurde auch durch HPLC-MS analysiert. Die Masse der zwei Haupt-Avilamycin-Derivate war 1343 (M+Na) und
20 1345 (M+Na). Bei einem Vergleich des Isotopenmusters der Haupt-Derivate aus der Mutante GW4 zeigte das Isotopenmuster der Hauptprodukte der Mutante GW4-AM1 keine spezifischen Signale für Chloridionen (Abb. 111), was darauf hindeutet, daß die Inaktivierung von *aviH* zum Verlust beider Chlorid-Atome führt. Die neuen Derivate wurden
25 Gavibamycin B 1 (Avilamycin A-Analogon) und Gavibamycin B3 (Avilamycin C-Analogon) genannt.

Gavibamycin B1 und B3 entsprechen der allgemeinen Formel I mit der folgenden Bedeutung für die Reste R1-R9:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
B1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
B3	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

5

Beispiel 8

Biologische Eigenschaften von Gavibamycin A3

Das antimikrobielle Spektrum von Gavibamycin A3 wurde bestimmt und mit dem von Avilamycin A verglichen. Dabei wurde die „broth-microdilution“-Methode gemäß den Vorschriften des nationalen Kommittees für klinische Labor-Standards angewandt. Beide Metaboliten zeigten antibiotische Aktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Staphylococcus aureus* Q48-1.2.1, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Enterococcus faecalis* H-7-6 und *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619.

Erste Tests zeigen weiter, daß Gavibamycin A3 etwas aktiver gegen verschiedene *Staphylococcus aureus* Stämme ist als Avilamycin A und es scheint zusätzlich viel hydrophiler zu sein wie an den R_f-Werten abzusehen ist. Auch die nicht-chlorierten Gavibamycin-Derivate waren antibiotisch aktiv.

25 Beispiel 9

Die Mutanten *S. viridochromogenes* GW2 und GW5 sowie die durch diese gebildeten erfindungsgemäßen Avilamycin-Derivate

Wie bei den Varianten GW4 und GW4-AM1 wurden basierend auf *S. viridochromogenes* Mutanten GW2 und GW5 hergestellt, wobei bei allen von beiden Mutanten synthetisierten Avilamycin-Derivaten jeweils R3 = OH ist und bei den Produkten der Mutante GW2 R6 = H und bei den Produkten der Mutante GW5 R9 = H ist. Dabei wurden völlig analog wie in den Beispielen 4 bis 6, insbesondere 5, vorgegangen, so dass bei GW2, einer Doppelmutante, neben aviG4 (s. Bsp. 4) auch aviG2 genetisch verändert (ausgeschaltet) wurde. Bei der Mutante GW5, ebenfalls einer Doppelmutante, wurde neben aviG4 auch aviG5 genetisch verändert (ausgeschaltet). An den erfindungsgemäßen Produkten dieser Mutanten GW2 und GW5 ist erkennbar, dass die entsprechenden Methyltransferasen (aviG2 bzw. aviG5 und jeweils aviG4) ausgeschaltet wurden.

Beispiel 10

Parenterale Applikationsform

5 g Gavibamycin A3 werden in 1 l Wasser, ggf. unter Einsatz eines pharmazeutisch gut verträglichen Löslichkeitsverbesserers, für Injektionszwecke bei Raumtemperatur gelöst und anschließend durch Zugabe von wasserfreier Glukose für Injektionszwecke auf isotone Bedingungen eingestellt.

Appliziert werden davon bei einem Durchschnittspatienten von ca. 65 kg Körpergewicht beispielsweise 0,5 ml also 2,5 mg bzw. $\approx 40 \mu\text{g/kg}$. Die verabreichte Dosis zeigte keinerlei Kontraindikation und erwies sich für die Patienten als gut verträglich. Auch eine bis zu 20-fach höhere Dosierung von Gavibamycin A3 erwies sich als toxikologisch unbedenklich und gut verträglich.

Beispiel 11

Zusammenfassend ist festzustellen, daß erfindungsgemäß eine detaillierte Sequenzanalyse des *avi* Gensatzes mehrere Merkmale aufweist, die ein

5 Modell eines biosynthetischen Stoffwechselwegs zu erfindungsgemäßen komplexen Oligosaccharid-Antibiotika vorschlagen. Die Funktion der für die Zuckerbiosynthese verantwortlichen Gene kann aus ihren Aminosäuresequenzen abgeleitet werden, die solchen Proteinen ähneln, die an der Biosynthese von D-Olivose in anderen Organismen beteiligt

10 sind. Wie für die Biosynthese von D-Olivose in *Streptomyces violaceoruber* Tü22 (Granaticin-Produzent) und *Streptomyces fradiae* (Urdamycin-Produzent) beschrieben, beginnt die Biosynthese vom Glukose-1-Phosphat, das zu dTDP-D-Olivose und dTDP-2-Desoxy-D-Evalose durch mehrere Enzyme konvertiert wird. Ein neues Merkmal in

15 diesem Stoffwechselweg ist, daß daran drei verschiedene dNDP-Hexose-4,6-Dehydratase-Gene beteiligt sind. Auf der Basis von Sequenzhomologien ist AviE1 eine dTDP-Glukose-4,6-Dehydratase und AviE3 eine GDP-Mannose-4,6-Dehydratase, was anzeigt, daß die Biosynthese von einigen dieser verschiedenen Zuckereinheiten aus

20 verschiedenen nukleotidgebundenen Hexosepools beginnt. Auf der Basis der Struktur von Avilamycin A und außerdem indiziert durch die vermeintliche Funktion von einigen Genprodukten beginnt die Biosynthese von D-Lyxose sogar von einem dritten Zucker-Pool, so daß es sich um ein Produkt des Pentose-Phosphat-Stoffwechselwegs handeln könnte. Rest H

25 von Avilamycin A ist ursprünglich als Methyleurekanat, abgeleitet von 2,3-di-O-Methylen-4,5-Dihydroxyhexansäure, beschrieben worden. Die erfindungsgemäße Sequenzanalyse allerdings zeigt, daß Methyleurekanat auch das Produkt eines biosynthetischen Zuckerstoffwechselwegs ist. Dies alles zusammengenommen läßt aufgrund der Zahl der

30 Zuckereinheiten darauf schließen, daß das Avilamycin-Cluster sechs

Glykosyltransferase-Gene aufweist. Allerdings sind nur vier im erfindungsgemäßen Avilamycin-Cluster gefunden worden. Eine denkbare Erklärung könnte die Beteiligung von einer oder mehr Glykosyltransferasen in mehreren Syntheseschritten sein oder die
5 Beteiligung von Glykosyltransferasen, die in Regionen außerhalb dieses Gen-Clusters codiert werden. Drei von vier Glykosyltransferasen erinnern stärker an Glykosyltransferasen für die Biosynthese von O-Antigen-Strukturen oder Zellwandpolysacchariden, was durch die polysaccharidähnliche Struktur von Avilamycinen erklärt werden kann.

10

Der *avi* Stoffwechselweg enthält sogar weitere interessante Merkmale: zwei Orthoesterbrücken und eine Methylenbrücke. Unter Berücksichtigung der oxidativen Natur dieser C-O-C-Arrangements dürften die α -Ketoglutarat-abhängigen Oxygnasen AviO1, AviO2 und AviO3 die Bildung
15 dieser seltenen Bindung katalysieren. Es wird daher erfindungsgemäß beschrieben, daß solche Enzyme molekularen Sauerstoff als direkten Elektronenakzeptor für die Oxidation durch den Gebrauch von α -Ketoglutarat als Cosubstrat verwenden und hierdurch schließlich die C-O-C-Bindungen, Succinat und CO₂ produzieren. Avilamycin A-
20 Heptasaccharid wird durch Methylierung, durch Ankopplung von Acetat, Ankopplung von Dichloroisoeberninsäure und durch Ankopplung von einer Isobutyryleinheit modifiziert. Sechs Methyltransferase-Gene sind im Cluster vorhanden, was der Zahl nach für die Avilamycin-Biosynthese ausreicht, während die Gene die für die Ankopplung der anderen Reste
25 verantwortlich sind, noch nicht lokalisiert worden sind. Interessanterweise wurde erfindungsgemäß herausgefunden, daß *aviB1* und *aviB2* solche Enzyme kodieren, die der Alpha- und der Beta-Kette von Komponenten 1 der 2-Oxosäuredehydrogenase-Komplexe ähnlich sind. Diese Komplexe werden normalerweise aus 3 enzymatischen Einheiten zusammengesetzt,
30 nämlich den TPP-abhängigen Dyhydrogenasen (Heterotetramere ($\alpha_2\beta_2$),

Dihydrolipoamide-Acetyltransferasen (Homomultimere) und Dihydrolipoamid-Dehydrogenasen (Homodimere). Die ORFs, die für die letztgenannten Komponenten dieser Komplexe kodieren, sind entweder noch nicht lokalisiert worden innerhalb des Clusters, liegen nicht im Cluster oder werden für die Biosynthese von Avilamycinen überhaupt nicht
5 gebraucht.

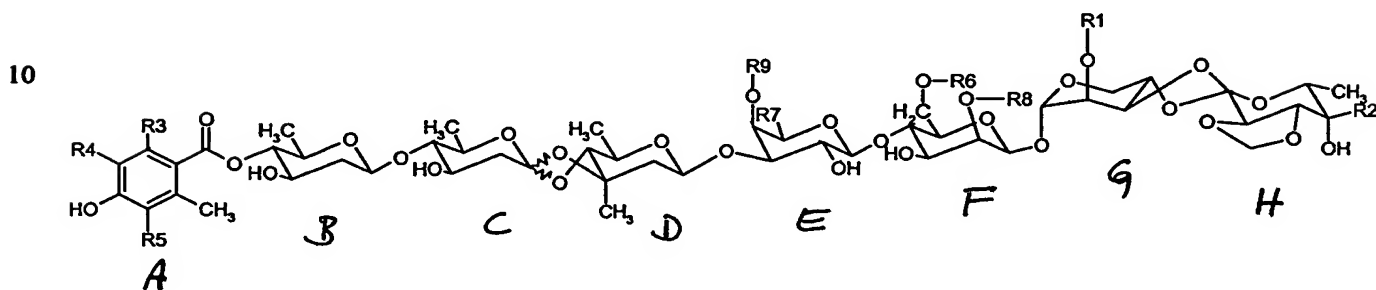
Weiterhin wurde Gavibamycin A3 auf seine antibiotische Aktivität getestet. Die ersten MIC-Versuche zeigten, daß Gavibamycin A3 etwas stärker
10 gegen verschiedene *Staphylococcus aureus*-Stämme als Avilamycin A aktiv ist. Darüber hinaus ist es etwas stärker hydrophil als Avilamycin A, wie durch die Retentionsfaktoren aus der DC- und HPLC-Analyse gezeigt wurde. Die nicht-chlorierten Gavibamycin-Derivate sind auch antibiotisch
aktiv.

Literatur:

- Buzzetti, F., Eisenberg, F., Grant, H.N., Keller-Schierlein, W., Voser, W., Zähler, H. (1968) *Experientia* 24(4): 320-323.
- 5 - Foster, D.R., Rybak, M.J. (1999) *Pharmacotherapy* 19:1111-1117
- Langer, E. (1987) Vergleichende Untersuchungen zur Wirkungsweise von Avilamycin A und Eveminomicin B. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Mertz, J.L., Peloso, J.S., Barker, B.J., Babbitt, G.E., Occolowitz, J.L.,
10 Simson, V.L., Kline, R.M. (1986) *Antibiot* 39(7): 877-887.
- Walker, C.A. (1976) Eveminomycin B - a possible site of action. 16th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy, Abstract 116
- Weitnauer, G., Bechthold, A. (1999) *PZ Prisma* 2:117-125.
- 15 - Wolf, H. (1973) *FEBS Lett* 36(2): 181-186.
- Wright, D. (1979) *Tetrahedron Lett.* 35:1207-1237
- Zähler, H. (1999) Tübingen, persönliche Mitteilung

Patentansprüche

1. Avilamycin-Derivat gemäß allgemeiner Formel I, auch in Form seiner Diastereomere oder Enantiomere bzw. racemischer oder anderer Gemische oder reiner Diastereomere und/oder Enantiomere,



, worin unabhängig voneinander mit unten folgender Ausnahme

R1 ausgewählt ist aus H, COCH₃, COC₄H₉, COCH(CH₃)₂ oder COCH₂CH₃,

R2 ausgewählt ist aus H, CHO, COCH₃ oder CH(OH)CH₃,

R3 OCH₃ entspricht,

R4 Cl entspricht,

R5 Cl entspricht,

R6 CH₃ entspricht,

R7 H, CH₃ oder CH₂OH entspricht,

R8 CH₃ entspricht

und

5

R9 CH₃ entspricht,

worin in Bezug auf mindestens einen der Reste R3-R6, R8 oder R9 in
Formel I abweichend von der voranstehenden Definition folgendes gilt:

10

R3 ist durch OH zu ersetzen,

R4 ist durch H zu ersetzen,

15

R5 ist durch H zu ersetzen,

R6 ist durch H zu ersetzen,

R8 ist durch H zu ersetzen

20

und/oder

R9 ist durch H zu ersetzen,

25

mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen
gemäß der jeweiligen Kombination in einer der Verbindungen 1 - 4
annehmen können:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
2	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

3	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
4	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃

2. Avilamycin-Derivat gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens R3 durch OH zu ersetzen ist, mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der Kombination in der Verbindung 1 annehmen können:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

3. Avilamycin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens R4 und R5 in Formel I durch H zu ersetzen sind.

4. Avilamycin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens R6, R8 und/oder R9 durch H zu ersetzen ist/sind, mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der Kombination in der Verbindung 3 oder nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der Kombination in der Verbindung 4 annehmen können:

Nr.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
3	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
4	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃

5. Avilamycin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß zum einen mindestens R3 durch OH zu ersetzen ist und zum anderen mindestens R4 und R5 durch H zu ersetzen sind oder mindestens R6, R8 und/oder R9 durch H zu ersetzen ist/sind.

6. Avilamycin-Derivat gemäß allgemeiner Formel I, auch in Form seiner Diastereomere oder Enantiomere bzw. racemischer oder anderer Gemische oder reiner Diastereomere und/oder Enantiomere, ausgewählt aus Verbindungen, in denen R1-R9 jeweils wie folgt kombiniert sind:

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	H	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃

	COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
4	COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	H	CH ₃	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	H	H	CH ₃
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
5	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	H

	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	H
	COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	H	CH ₃	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	H
6	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH ₂ CH ₃	H	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	H	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	H	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	H	CH ₃	H	H
	COC ₄ H ₉	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	H	H	CH ₃	H	H
	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₂ OH	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	CHO	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	H	H	H
	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	H	H

, vorzugsweise

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H
COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OH	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H

- 5 7. Avilamycin-Derivat, dadurch erhältlich, daß in einer kultivierbaren Zelle, die die nötigen Gene bzw. Enzyme zur Synthese eines Orthosomycin-Grundkörpers bestehend aus

- (a) einem endständigen Dichloroisoeberninsäure-Rest (A in Formel I) und
- (b) einem damit veresterten, über normale Esterbindung und Orthoesterbindungen verknüpften Heptasaccharid (B bis H in Formel I) aus:

5

- (i) zwei D-Olucose-Resten (B und C)
- (ii) einem 2-Desoxy-D-Valose-Rest (D),
- (iii) einem D-Fucose-Rest (E),
- (iv) einem D-Mannose-Rest (F),
- (v) einem L-Lyxose-Rest (G) und
- (vi) einem (Methyl-)Eurekanat Rest (H)

10

aufweist, mindestens eine Nukleinsäure, deren Sequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Abbildungen 1 bis 54 entspricht, gentechnologisch verändert, deletiert oder nicht exprimiert wird, die so modifizierte Zelle kultiviert wird, der Kulturüberstand gewonnen und aufgearbeitet wird, das oder die Avilamycin-Derivat/e aufgereinigt und isoliert wird und gegebenenfalls verschiedene Derivate getrennt werden,

15

20

mit der Maßgabe, daß R1-R9 nicht gleichzeitig die Bedeutungen gemäß der jeweiligen Kombination in einer der Verbindungen 1 - 16 annehmen können:

25

Nr	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OH	H	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
2	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
3	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
4	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃
5	COCH(CH ₃) ₂	CHO	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

6	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
7	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
8	COCH ₂ CH ₃	H	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
9	COCH ₃	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
10	COCH(CH ₃) ₂	CH(OH)CH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
11	H	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
12	COCH ₃	CH(OH)CH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
13	H	CH(OH)CH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
14	COC ₄ H ₉	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
15	COCH ₂ CH ₃	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
16	COCH(CH ₃) ₂	COCH ₃	OCH ₃	Cl	Cl	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	CH ₃

8. Avilamycin-Derivat gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die kultivierbare Zelle ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* oder einer Zelle, die mit Ausnahme der gentechnologisch veränderten, deletierten oder nicht exprimierten Nukleinsäure/n die Nukleinsäuren gemäß einer Sequenz einer der laufenden Nr. 1-54 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) bzw. dazu zu mindestens 95%, vorzugsweise 97 %, homologe Nukleinsäuren enthält oder das Gencluster gemäß Abb. 109 enthält, vorzugsweise ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes*, insbesondere einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57.
9. Avilamycin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die veränderte/n Nukleinsäure/n für eine Methyltransferase und/oder für eine Halogenase kodierte/n.
10. Avilamycin-Derivat gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz/en der veränderte/n Nukleinsäure/n vor der Veränderung zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der/den Nukleinsäuresequenz/en mindestens einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1 oder 2-7 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), vorzugsweise einer der Sequenzen mit laufender Nr.

1, 2, 4 oder 6 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entspricht, insbesondere der Sequenz mit laufender Nr. 2 oder den Sequenzen mit den laufenden Nr. 2 und Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 4 oder Nr. 2 und Nr. 6 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1).

5

11. Avilamycin-Derivat gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Nukleinsäure/n dazu führt, daß das oder die durch die gentechnologisch veränderte/n Nukleinsäure/n kodierte/n Protein/e oder Polypeptid/e nach der
10 gentechnologischen Veränderung nicht mehr synthetisiert wird/werden.
12. Avilamycin-Derivat, gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, 6 oder 7 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es hydrophiler ist als
15 Avilamycin A oder C bzw. Evernimycin (Ziracin).
13. Nukleinsäure in ihrer Sequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, entsprechend der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1 bis 51 (gemäß
20 Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1).
14. Nukleinsäure gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der
25 Sequenzen mit laufender Nr. 1 bis 32 und 48 bis 51 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), vorzugsweise 1 bis 7, insbesondere 1, 2, 4 oder 6, entspricht.
15. Gencluster enthaltend „Open reading frames“, vorzugsweise 54, die
30 in ihrer Nukleinsäuresequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, den Nukleinsäuresequenzen gemäß

den Sequenzen mit laufender Nr. 1 bis 54 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entsprechen und die auf einem Nukleinsäurestrang angeordnet sind, vorzugsweise gemäß Abb. 109.

- 5 16. Protein oder Polypeptid in seiner Aminosäuresequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, entsprechend der Aminosäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit laufender Nr. 55 – 104 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1).
- 10 17. Protein oder Polypeptid gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder Polypeptid zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit laufender
- 15 Nr. 55 bis 86 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), vorzugsweise 55 bis 61, insbesondere 55, 56, 58 oder 60, entspricht.
18. Protein oder Polypeptid kodiert durch eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14.
- 20 19. Gentechnologisch veränderte Zelle enthaltend mindestens eine nicht endogene Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14, einen nicht-endogenen Gencluster gemäß Anspruch 15 und/oder ein nicht-endogenes Protein oder Polypeptid gemäß
- 25 einem der Ansprüche 16-18.
20. Zelle enthaltend mindestens eine gentechnologisch veränderte Nukleinsäure, deren Sequenz vor der Veränderung zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der
- 30 Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1 bis 54 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entsprach.

21. Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes*, vorzugsweise vom Subtyp Tü57, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Nukleinsäuren mit einer Sequenz gemäß einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1-54 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) gentechnologisch verändert oder deletiert wurde.
22. Zelle gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Nukleinsäuren mit einer Sequenz gemäß einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1 oder 2-7 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), vorzugsweise mit einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1, 2, 4 oder 6 (Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), insbesondere mit einer Sequenz mit laufender Nr. 2 oder mit den Sequenzen mit den laufenden Nr. 2 und Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 4 oder Nr. 2 und Nr. 6 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1), gentechnologisch verändert oder deletiert wurde.
23. Zelle gemäß Anspruch 21 vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW4, *Streptomyces viridochromogenes*, GW4-AM1, *Streptomyces viridochromogenes* GW2 oder *Streptomyces viridochromogenes* GW5, dadurch gekennzeichnet, daß vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW4 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH ist, vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW4-AM1 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH, R4 = H und R5 = H sind, vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW2 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH und R6 = H sind und vom Mutanten-Typ *Streptomyces viridochromogenes* GW5 Avilamycin-Derivate synthetisiert werden, in denen R3 = OH und R9 = H sind.

24. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14, eines Genclusters gemäß Anspruch 15, eines Proteins oder Polypeptids gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 und/oder einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 19 bis 22 zur Herstellung eines Avilamycin-Derivats, vorzugsweise gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12.

25. Verfahren zur Herstellung von Avilamycin-Derivaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 gekennzeichnet durch folgende Schritte:

(1) in einer kultivierbaren Zelle, die die nötigen Gene bzw. Enzyme zur Synthese des Orthosomycin-Grundkörpers bestehend aus

(a) einem endständigen Dichloroisoeberninsäure-Rest (A in Formel I) und

(b) einem damit veresterten, über normale Esterbindung und Orthoesterbindungen verknüpften Heptasaccharid (B bis H in Formel I) aus:

(i) zwei D-Olivose-Resten (B und C)

(ii) einem 2-Desoxy-D-Evalose-Rest (D),

(iii) einem D-Fucose-Rest (E),

(iv) einem D-Mannose-Rest (F),

(v) einem L-Lyxose-Rest (G) und

(vi) einem (Methyl-)Eurekanat Rest (H)

aufweist, wird mindestens eine Nukleinsäure, deren Sequenz zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der Nukleinsäuresequenz gemäß einer der Sequenzen mit laufenden Nr. 1 bis 54 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1)

entspricht, gentechnologisch verändert, deletiert oder nicht exprimiert,

- 5
- (2) die so gentechnologisch veränderte Zelle wird kultiviert,
 - (3) der Kulturüberstand wird gewonnen,
 - (4) der Kulturüberstand wird aufgearbeitet und dabei das oder die entstandene/n Avilamycin-Derivat/e aufgereinigt und isoliert,
 - (5) gegebenenfalls werden unterschiedliche Derivate getrennt.

10 26. Verfahren gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die kultivierbare Zelle ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* oder einer Zelle, die mit Ausnahme der gentechnologisch veränderten, deletierten oder nicht exprimierten Nukleinsäure die Nukleinsäuren gemäß einer Sequenz mit laufender Nr. 1-54 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) bzw. dazu
15 zu mindestens 95%, vorzugsweise 97 %, homologe Nukleinsäuren enthält oder den Gencluster gemäß Anspruch 14 enthält, vorzugsweise ausgewählt ist aus einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes*, insbesondere einer Zelle vom Typ *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57.
20

27. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß die veränderte/n Nukleinsäure/n für eine Methyltransferase und/oder für eine Halogenase kodiert/en.

25

28. Verfahren gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz/en der veränderte/n Nukleinsäure/n vor der Veränderung zu mindestens 95%, vorzugsweise 97%, insbesondere genau, der/den Nukleinsäuresequenz/en mindestens einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1 oder 2-7 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1),
30 vorzugsweise einer der Sequenzen mit laufender Nr. 1, 2, 4 oder 6

(Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1) entspricht, insbesondere der Sequenz mit laufender Nr. 2 oder den Sequenzen mit den laufenden Nr. 2 und Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 4 oder Nr. 2 und Nr. 6 (gemäß Tabelle 1 i.V.m. Abb. 1).

5

29. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 25 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Veränderung der Nukleinsäure/n dazu führt, daß das oder die durch die gentechnologisch veränderte/n Nukleinsäure/n kodierte/n Protein/e oder Polypeptid/e nach der
10 gentechnologischen Veränderung nicht mehr synthetisiert wird/werden.

15

30. Arzneimittel enthaltend Avilamycin-Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 sowie gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

20

31. Verwendung eines Avilamycin-Derivats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Herstellung eines Arzneimittels mit antibiotischer Wirkung zur Behandlung bzw. zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, bspw. Infektionskrankheiten.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Avilamycin-Derivate, gentechnologische biosynthetische Verfahren zu deren Herstellung, Arzneimittel enthaltend
5 diese Verbindungen, sowie die Verwendung dieser Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels gegen Infektionskrankheiten wie auch Nucleinsäuren, Proteine und Gencluster und entsprechende Zellen, die mit der Herstellung dieser Avilamycin-Derivate verbunden sind.